

VU Research Portal

The diversity of osteoclast precursors and their responses to inflammatory cytokines

Cao, Y.

2017

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Cao, Y. (2017). *The diversity of osteoclast precursors and their responses to inflammatory cytokines*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Osteoclasten spelen een cruciale rol in ontstekingsgerelateerde botziekten zoals reumatoïde artritis en parodontitis. Tijdens ontsteking scheiden immuuncellen binnen het ontstoken weefsel een verscheidenheid aan ontstekingscytokinen uit die osteoclast-gemedieerde botresorptie beïnvloeden. Enkele prominente cytokinen zijn interleukine 1 (IL-1), interleukine 6 (IL-6) en tumornecrosis factor α (TNF- α). Onlangs hebben diverse studies aangetoond dat osteoclasten van verschillende botten fenotypisch verschillend zijn. Dit zou kunnen komen doordat deze osteoclasten afkomstig zijn van verschillende voorlopercellen. In dit proefschrift richten we ons op osteoclastvoorlopercellen die aanwezig zijn in het beenmerg. Drie subsets van beenmerg-osteoclastvoorlopercellen kunnen worden gecategoriseerd op basis van de membraan expressie van CD31 en Ly-6C. De subsets zijn: vroege blasten, myeloïde blasten en monocytën. Het doel van dit proefschrift was om te ontrafelen: (1) Of de verschillende osteoclastvoorlopercellen verschillen in hun respons op inflammatoire cytokines zoals IL-1 β en TNF- α . (2) Hoe een ontstekingsmuismodel de osteoclastprecursorpool beïnvloedt en (3) hoe de morfologie is van osteoclasten van verschillende skeletdelen.

In **hoofdstuk 2** werd aangetoond dat IL-1 β verschillende stimulerende effecten had op de subsets van de muis beenmerg-osteoclastprecursors. (1) IL-1 β versnelde de proliferatie van vroege blasten, maar niet van myeloïde blasten en monocytën. In overeenstemming hiermee bleek de expressie van cyclin D1, een regulerend gen voor proliferatie, in vroege blastkweken verhoogd te zijn. (2) Verder bleek dat IL-1 β celfusie van alle drie de subsets stimuleerde, waarbij dat in de myeloïde blastkweken het meest uitgesproken was. In aanwezigheid van IL-1 β reageerden myeloïde blasten het snelst door grote osteoclasten te vormen en ook het hoogste aantal grote osteoclasten werd gevonden in deze kweken. mRNA-expressie gaf aan dat de meeste van de osteoclast-gerelateerde genen, zoals TRAcP, cathepsine K, DC-STAMP, evenals de receptor van IL-1, IL-1RI, significant werden verhoogd in myeloïde blastkweken. Deze bevindingen laten zien dat myeloïde blasten de voorlopers zijn die het meest gevoelig zijn voor IL-1 in het proces van osteoclastvorming. (3) Hoewel IL-1 β ook de osteoclastogenese van monocytën en botresorptie stimuleerde, reageerden monocytën het minst snel op IL-1 β en vormden hierbij het laagste aantal osteoclasten. Echter, monocyt-afgeleide osteoclasten hadden de langste levensduur. Samengevat heeft IL-1 β een stimulerend effect op alle muis beenmerg-osteoclastprecursor subsets, maar het effect verschilde

per type subset.

Of de drie osteoclastprecursor-subsets ook op een ander inflammatoire cytokine reageren, te weten TNF- α , is onderzocht in **hoofdstuk 3**. Afwijkend van IL-1 β stimuleerde TNF- α alleen vroege blasten en myeloïde blasten; de osteoclastogenese van monocytten werd sterk geremd wanneer deze op plastic werden gekweekt. Echter, wanneer monocytten op bot werden gekweekt of vooraf werden gestimuleerd met M-CSF en RANKL gevolgd door de toevoeging van TNF- α , bleek TNF- α de osteoclastogenese te stimuleren. qPCR en FACS analyses gaven aan dat blootstelling aan TNF- α leidde tot een verminderde (mRNA)-expressie van RANK, NFATc1 en TRAcP. Dit werd uitsluitend waargenomen in monocyttecellen. Tevens bleek bij deze cellen de verhouding van gebonden-RANK/ongebonden RANK te veranderen. Op basis van deze bevindingen hebben we het volgende geponeerd: (i) onder normale omstandigheden bindt RANKL aan RANK en induceert de RANKL/RANK signaleringsroute voor osteoclastogenese; (ii) Wanneer TNF- α aan het begin van de kweek samen met M-CSF en RANKL wordt toegevoegd aan cellen die op plastic gekweekt zijn, wordt RANK-signalering niet geactiveerd, wat leidt tot een geremde osteoclastogenese; (iii) Een dergelijk remmend effect kan voorkomen worden wanneer monocytten eerst gekweekt worden met M-CSF en RANKL dus vóór toevoeging van TNF- α . Nadat de RANKL/RANK route is gestimuleerd door binding van RANKL aan RANK, stimuleert TNF- α de osteoclastogenese van monocytten.

In **hoofdstuk 4** bleek de osteoclastprecursorpool van IL-1RA knock-outmuizen verschillend beïnvloed te worden in verschillende skeletdelen. De IL-1RA knock-out muis, waarbij sprake is van een continu IL-1 signaal, wordt beschreven als model voor spontane artritis. In deze studie vergeleken we de osteoclast voorlopercellen en de osteoclastogenese van beenmergcellen van pijpbeen, schedeldak, wervel en kaak. Gevonden werd dat het percentage myeloïde blasten en monocytten in het pijpbeen was verhoogd en het percentage monocytten in de kaak van de IL-1RA knock-out muizen was vermeerderd. De beenmergcellen, uit de verschillende skeletdelen, van IL-1RA knock-outmuizen vertoonden een verhoogde osteoclastogenese en mineraal-oplos capaciteit. Dus verschillende skeletdelen werden verschillend beïnvloed met betrekking tot osteoclastogenese: deletie van IL-1RA stimuleerde de osteoclastprecursors van pijpbeen en kaak tot meer osteoclastvorming en botresorptie. In het schedeldak bleek de doorlopende IL-1 signalering de gevoeligheid van de voorlopercellen voor IL-1 verhoogd te hebben. Ook dit resulteerde in een sterk verhoogde osteoclastogenese en

botresorptie.

In **hoofdstuk 5** werd de morfologie van osteoclasten en botmetabolisme bestudeerd in muizen waarbij het microfilament geassocieerde eiwit adseverine niet tot expressie kwam. Er werd aangetoond dat het botmetabolisme niet werd beïnvloed in adseverine knock-out muizen. Echter, de grootte van de osteoclasten in de adseverine knock-out muizen was afgenomen, ondanks het feit dat het aantal osteoclasten, de structuur van de borstelzoom en aanhechtingszone vergelijkbaar waren tussen knock-out en wildtype muizen. Ook op ultrastructureel niveau werd geen verschil gevonden tussen de osteoclasten van het alveolaire bot en pijpbeen. Een ontsteking geïnduceerd rondom de kiezen had eveneens geen effect op de morfologie van de osteoclasten. Wel vonden we dat de osteoclastkernen in adseverine knockout muizen kleiner waren en ze bevatten meer heterochromatine. Deze bevindingen suggereren dat adseverine een rol speelt bij de structuur van de osteoclast.

In dit proefschrift geven we inzicht in de osteoclastvormende potentie van verschillende voorlopercellen en hun respons op enkele cytokinen. We concluderen dat verschillende osteoclastvoorloper subsets, anders reageren op ontstekingsfactoren, maar ook dat er variatie is tussen de verschillende skeletonderdelen. Deze gegevens kunnen helpen om verschillen in bot-specifieke osteoclastogenese en botafbraak onder zowel fysiologische als ontstekingsomstandigheden te verklaren.